

合成酶基因有两种可能的连接方向,所以能产生两个不同的重组质粒 pNo 1 和 pNo 2(见图 5)。

pNo 1 和 pNo 2 分别引入带 pTiC 58 的根瘤农杆菌中,经两次同源重组,产生四种重组子,然后分别感染植物,发现都能产生胭脂碱,但 pNo 1 × pTiC 58 还能产生章鱼碱,因而表明胭脂碱合成酶基因的启动子能启动正常顺序的章鱼碱合成酶基因的编码顺序,从而使后者得到表达。

利用类似的方法, Herrera-Estrella 等(1983)构建了由胭脂碱合成酶基因启动子(pNos)与细菌氯霉素乙酰转移酶基因(Cat)组成成 pNos-Cat 嵌合基因,引入 pTiC 58 质粒做载体转化植物,转化的植物具备了正常植物所没有的抗氯霉素的能力,也即 Cat 基因在植物中,也能象在酵母和哺乳动物中那样得到表达<sup>[14]</sup>。

进一步分析表明,由胭脂碱合成酶基因启动子和外源基因编码区组成的嵌合基因,在转化植物中能通过减数分裂传给子代,并且符合典型的孟德尔遗传规律<sup>[15-17]</sup>。

能在植物中表达的抗性嵌合基因的构建,为筛选转化植物带来了极大的方便,特别是胭脂碱合成酶基因的启动子和细菌转座子 Tn 5 上的新霉素磷酸转移酶基因, R 17 质粒上的

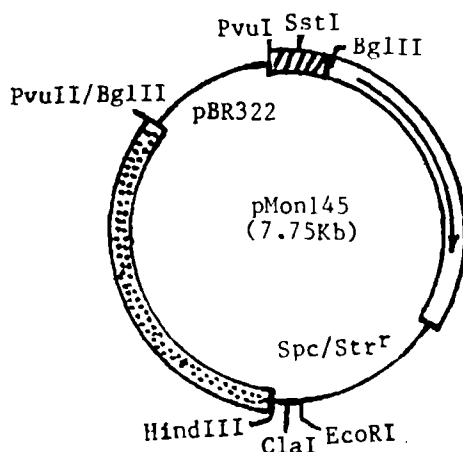


图 6 pMon 145 结构示意图<sup>[21]</sup>

▨表示 Ti 质粒 T-DNA 同源片段,  
□表示嵌合新霉素磷酸转移酶基因

二氢叶酸还原酶基因和 pIT 139 质粒上的潮霉素(Hygromycin)磷酸转移酶基因组成的嵌合基因,使转化的植物分别带上了相应的抗性<sup>[18-20]</sup>。从而人们找到了筛选转化植物的新途径,不需要冠瘿瘤产生及在 MSo 培养基上自主生长作为 T-DNA 转化的标记。

美国 Monsanto 公司的 Broglie 等(1984)将在植物中表达的嵌合新霉素磷酸转移酶基因(抗卡那霉素)插入了中间载体 pMon 120 构成了 pMon 145(见图 6)<sup>[21]</sup>。嵌合基因的构建使中间载体的使用更为方便。(待续)

## 细胞的有被小泡

曹 英

(昆明植物研究所)

### 一、概 述

1961 年 Gray, E. G. 在用电镜研究大鼠的小脑皮层神经细胞时,发现树状神经末梢的细胞质内存在一些具有外壳的小泡,他当时

称之为复合小泡(complex vesicles)<sup>[1]</sup>。继后 Wissig(1962)在大鼠肾上皮细胞中观察到质膜小泡与胞质小泡的结构分化,并且发现一类小泡的原生质膜表面覆盖有绒毛状物质,形成有被小泡(Coated Vesicles)<sup>[2]</sup>。

在植物中,许多学者也观察到根尖的各种正在分化的细胞和幼叶细胞中大量存在有被小泡,与此同时, Roth 和 Porter (1962) 发现了细胞表面有摄取蛋白质的特化部位,因为在此部位细胞膜下凹且原生质膜表面覆盖着一层与有被小泡相似的包被结构,所以把这一特化区域称为有被小窝 (coated pits)<sup>[3]</sup>,从此不少细胞生理学家注意到有被小泡和有被小窝与细胞功能的关系,并认为这两种结构是动、植物细胞中最基本的细胞器。Pearse(1981)<sup>[19]</sup>曾指出,有被小泡和有被小窝这两种相关的细胞器负责真核细胞的选择性内吞,迁移膜蛋白的特异胞内运输,新合成蛋白质的分泌以及质膜循环等<sup>[4]</sup>。

## 二、包被的组成和结构

包被由蛋白质构成,其中最主要的蛋白质是包涵蛋白或称包涵素(Clatrin),其他蛋白质可称为附加蛋白(Accessory Proteins),由这些蛋白质形成包被的结构单位——三叉辐射型单体(triskelion),它包括三条重链和三条轻链,多肽链的分子量为180 k和30 k—40 k,由单体聚合成多面体(五面体和六面体)网格状的包被,酷象足球上的花样<sup>[5,15]</sup>,但这一结构并不是一成不变的。现一般认为有被小泡是由有被小窝出芽而来,这一过程伴随包被结构的重排<sup>[7]</sup>。

## 三、有被结构与细胞功能

1. 受体中介的胞吞作用 (receptor-mediated endocytosis) 大分子与细胞表面的受体结合通过有被区的内化进入细胞,这一过程称为受体中介的胞吞作用,也叫吸收性内吞 (absorptive endocytosis)<sup>[5]</sup>,它比液相吞饮快得多,能使细胞大量摄入特定分子而不需要带进太多的胞外液体,所以它实际上具有一种选择浓缩机制。这一作用的最重要例子是动物细胞对胆固醇的吸收<sup>[5]</sup>,胆固醇与血液中的极低密度脂蛋白 LDL 结合,当动物细胞需要胆固醇进行细胞膜合成时,就产生 LDL 受体并插入

膜内,许多受体与质膜的有被区相连,此区内化使 LDL 同其受体一起进入有被小泡,有被小泡很快失去包被成为胞内体(endosome),然后与初级溶酶体结合并释放胆固醇,受体又回到细胞表面<sup>[5]</sup>。用人的成纤维细胞 LDL 受体突变株研究发现,虽然其 LDL 受体能结合 LDL,却不能聚集于有被区,因而不能内化,这就直接证明了有被小窝在受体中介的胞吞作用中的重要性<sup>[6]</sup>。

2. 迁移膜蛋白的运输 许多蛋白质如膜转输蛋白、铁传递蛋白、胰岛素、asialoglycoprotein、 $\alpha$ 2-巨球蛋白、表皮生长因子 (epidermal growth factor) 等的受体,都与 LDL 受体一样,不断地在细胞内从一个细胞器移动到另一细胞器,这些受体蛋白可称为迁移膜蛋白 (migrant membrane proteins),与组成膜蛋白 (resident proteins) 相区别<sup>[6]</sup>。当这些迁移受体蛋白到达一种细胞器时便与该细胞器的膜成分融合,在移往另一细胞器之前,受体必须与膜分离,对于质膜这种分离发生在有被区,即迁移膜蛋白被浓集于有被小窝,而组成膜蛋白不被浓集。在这方面 Bresther 已作了详细说明,他发现一些主要的细胞膜表面蛋白如 theta 抗原、H<sub>3</sub> 抗原不在有被区集聚<sup>[6]</sup>。可以推测,有被区与迁移膜蛋白之间有某种识别信号, Brown (1983) 认为许多受体在细胞内都有同一的运动路线,说明它们的调节信号也是共同的<sup>[6]</sup>。

受体结合配体对受体参与有被区并开始受体的胞内循环是不是必需的? 现已用实验证明 LDL 受体,  $\alpha$ 2-巨球蛋白和 asialoglycoprotein 受体都是在不停的运转着。有被区本身在不断地内化循环,在许多细胞内,有被区占细胞表面的2%,每3分钟就更换一次<sup>[6]</sup>,但也发现有很多表面受体仅当结合配体后才与有被区相连,如胰岛素的受体蛋白在成纤维细胞膜表面分散排布,当结合胰岛素后,胰岛素-受体复合物与有被区连接并内化,推测胰岛素结合受体后,使受体蛋白的构象变化,因而被有被区

的某种蛋白成分识别。

**3. 新合成蛋白质的运输** 早在1965年, Bruni 和 Portor<sup>[8]</sup>就发现大鼠肝细胞能浓集并分离来自内质网的两类蛋白质:一类由高尔基大液泡运输分泌到细胞之外;一类由来自高尔基体的有被小泡运输,很可能运往溶酶体。Bonnett 和 Newcomb(1966)研究胡萝卜根毛生长时,也发现根毛细胞中有类似的富集和分室效应:最初碳水化合物和蛋白质均存在于高尔基大液泡中,然后从大液泡末端出芽产生有被小泡,蛋白质被浓集在有被小泡内,碳水化合物仍留在光滑的大液泡中<sup>[9]</sup>。Valk 和 Fowke(1981)用透射电子显微镜观察了烟草原生质体的超薄切片,发现大量的有被小泡、与质膜和高尔基体的成熟面相连<sup>[9]</sup>。最近, Griffing 和 Fowke(1985)对大豆 *Glycine max L* 的悬浮培养细胞和原生质体的过氧化物酶进行超微定位时也观察到两大类型的有被小泡:质膜生成的有被小泡(外径70—100 nm)和高尔基体生成的有被小泡(外径50—70 nm),他们推测后者可能参与导向液泡的过氧化物酶的运输或浓集<sup>[10]</sup>。虽然植物细胞中的有被小泡一直被认为具有分泌胞壁蛋白的功能,但近来的研究表明质膜生成的有被小泡参与细胞内吞而不是胞分泌。

#### 四、包被蛋白在细胞内的动态

在受体中介的胞吞过程中,来自有被区的有被小泡在转变成胞内体之前会迅速脱去包被。最近 Altstiel 等人(1983)已用荧光检测技术发现了包被的存在会抑制有被小泡与细胞器的融合<sup>[11]</sup>,既然包涵蛋白可以可逆地结合于有被小泡的原生质膜表面形成紧密的多面体网络结构,所以不难理解有被小泡在与细胞器融合前必须先去掉或部分去掉包被结构。那么,细胞内是否存在一个游离的包涵蛋白库(pool)呢?近几年来对这一问题研究较多:(1) Anderson(1978)<sup>[11]</sup>, Kartenbeck(1981)<sup>[13]</sup>等用免疫化学的方法制备抗包涵蛋白的单克隆

抗体进行实验,结果是在细胞质中没有检测到包涵蛋白;(2) Louvard 等人(1983)<sup>[14]</sup>制备了一种识别包涵蛋白重链上抗原决定簇的单克隆抗体进行实验,结果表明在细胞质中存在一种不溶性包涵蛋白库;(3)最近, Goud 等人(1985)<sup>[4]</sup>用酶免疫检测法测定大鼠的几种细胞的胞浆中包涵蛋白的含量,发现不同类型的细胞(胞吞和胞分泌程度不同)包涵蛋白的含量(占总蛋白的百分数)相似,如成纤维细胞为0.18%,骨髓瘤细胞为0.16%,淋巴细胞为0.11%,肝细胞为0.07%。但脑皮层细胞却异常地高达0.75%。高速离心可以把细胞内的包涵蛋白分成两部分,即存在于上清液中的非聚合态和沉淀中的聚合态,它们各自所占的比例随细胞种类不同而变化甚大。由此得出结论:真核细胞中包涵蛋白的含量与受体中介的胞吞作用和胞内运输并不相关,但在胞吞和胞吐活跃的细胞内聚合态的包涵蛋白所占的比例似乎更大。

#### 五、去被蛋白

去被的过程很可能是酶参与的。Schmid 等人(1984)从牛脑细胞中提纯到一种活性蛋白质,分子量为70 k道尔顿,认为这是去被ATP酶(uncoated ATPase,简称为UcATPase),该酶作用于ATP,释放能量驱动包涵蛋白的解离<sup>[16]</sup>,他发现包涵蛋白聚集态的三叉辐射型单体上存在轻链是去被蛋白与包涵蛋白结合的先决条件,从而也是UcATPase活性表达和包被解体的前提,而任何游离的、具轻链的三叉辐射型单体或游离的轻链均不能被去被蛋白识别<sup>[16]</sup>。Ungewickell(1984)推测去被蛋白与包涵蛋白的结合和继后的ATP水解导致了包涵蛋白的轻链构象变化或者使其在重链上的结合位点发生变化,这样,当三叉辐射型单体的两个叉游离出来时就不能重新结合了,第三个叉游离即引起该单体脱离网格状的包被<sup>[16]</sup>。

综上所述,细胞的有被结构与细胞的活跃生理功能有密切关系,作为细胞内重要的运载

工具,有被小泡本身还具有酶活性:大鼠肝细胞的有被小泡中发现有NADH-单脱氢抗坏血酸还原酶和抗坏血酸氧化酶<sup>[17]</sup>;大豆细胞的有被小泡中存在过氧化物酶<sup>[10]</sup>。但一般的细胞生物学书籍并没有把有被小泡写作动、植物细胞中正式的细胞器,我想最主要的原因是有被小泡大多存在于那些高度特化、合成代谢旺盛的细胞中,但是,有被小泡在动、植物很多细胞中都存在,研究和弄清它的作用将对广义发育原则<sup>[18]</sup>提供更充分的依据。

### 摘 要

有被小泡是细胞膜的特化结构之一,因其膜外覆盖一层网络状的包涵蛋白而得名。至今认为有被小泡在动、植物细胞中均存在,参与胞内运输、膜循环等细胞内重要生理过程。有被小泡的包被结构本身可能包含了某种信号,通过分子间识别去完成一系列细胞功能,不过在植物中还没有直接的实验证据表明有被小泡的功能。

### 参 考 文 献

- [1] Gray, E. G., 1961, *J. Anat.*, 95: 345—356.  
 [2] Wissig, S. L., 1962, *Anat. Rec.*, 142: 292.  
 [3] Bonnett, H. T. and Newcomb, E. T.,

- 1966, *Protoplasma*, 62: 59—75.  
 [4] Goud, B., Huet, C. and Louvard, D., 1985, *J. Cell Bio.*, 100: 521—527.  
 [5] Alberts, B., Bray, D., et al (eds.) 1983, *Molecular Biology of the Cell*, pp. 307—311, Garland, N. Y. & London.  
 [6] Brown, M. S. and, 1983, *Cell*, 32: 663—667.  
 [7] Brown, M. S. and Goldstein, J. L., 黄仲平译 1985, 科学, 第三期: 20—30.  
 [8] Bruni, C. and Portor, K. R., 1965, *Aner. J. Pathol.*, 46: 691.  
 [9] Valk, P. van der and Fowke, L. C., 1981, *Can. J. Bot.*, 59: 1037—1313.  
 [10] Griffing, L. R. and Fowke, L. C., 1985, *Protoplasma*, 128: 22—30.  
 [11] Altstiel, L. and Branton, D., 1983, *Cell*, 32: 921—929.  
 [12] Anderson, R. G. W., Vasil, E., et al, 1978, *Cell*, 15: 919—933.  
 [13] Kartenbeck, J., Schmid, E., et al, 1981, *Exp. Cell Res.*, 133: 191—211.  
 [14] Louvard, D., Morris, C., et al., 1983, *EMBO(Eur. Mol. Biol. Organ.) J.*, 2: 1655—1664.  
 [15] Ungewickell, E., 1984, *Nature*, 311: 213.  
 [16] Schmid, S. L., et al, 1984, *Nature*, 311: 228—231.  
 [17] Sun, I. Ris., Morre, D. J., et al, 1984, *Biochim. Biophys. Acta.*, 797: 266—275.  
 [18] Olson, M. V., 孙祥燮译, 1983《科学年鉴》, 威廉H. 诺尔斯主编, 154—158页, 科学出版社。  
 [19] Pearse, B. & Bretscher, M. A., 1981, *Rev. Biochem.*, 50 85.

## 植物组织培养的次生代谢产物

### Ⅲ.用改良培养基的方法生产紫草宁

山田 康之

紫草宁(Shikonin)系紫草(*Lithospermum erythrorhizon* Sieb et Zucc)等部分紫草科植物根中所含的 $\alpha$ -萘醌系列的化合物(图1),用作治疗外伤与痔疮的药物或高级染料。

田端等<sup>[1,2]</sup>从紫草的幼苗诱发愈伤组织,用琼脂

培养基生产紫草宁,用细胞筛选的方法从亲本植物中获得优良细胞株。作者等引入这一优良细胞株,首先用液体培养的方法来生产紫草宁获得成功,继而使生产率获得极大的提高。本文叙述作者所开发的生产紫草宁的培养方法。